

ارزیابی مراحل مختلف سیکل استروس بر خیز مغزی و پیامدهای نورولوژیک بعد از ضربه شدید مغزی در موش صحرایی ماده

علی سیاه‌پشت خاچکی^۱ (M.Sc)، محمد خاکساری حداد^{۲*} (Ph.D)، نادر شاه‌رخی ساردو^۱ (Ph.D)، غلامرضا سپهری^۱ (Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

۲- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و مرکز آموزش بین‌الملل بهم

چکیده

سابقه و هدف: یکی از عوامل موثر بر بهبودی بعد از جراحت تروماتیک مغزی (TBI)، جنسیت است. در طی فازهای سیکل استروس میزان استروژن و پروژسترون پلازما تفاوت چشم‌گیری دارد. بنابراین، در مطالعه حاضر نقش متفاوت احتمالی این فازها را در تشکیل خیز مغزی و پیامدهای نورولوژیکی ناشی از ترومای شدید مغزی بررسی شد. مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی ماده بالغ نژاد Albino N-MARI به ۶ گروه ۱۴ تایی شامل: ۱- حیوانات با فاز مت استروس ۲- حیوانات با فاز دی استروس ۳- حیوانات با فاز پرواستروس ۴- حیوانات با فاز استروس ۵- حیوانات فاقد تخمدان (OVX) و ۶- گروه شم (فاقد تخمدان و بدون ضربه) تقسیم شدند. در این گروه‌ها، محتوای آبی ایوانز برای ارزیابی نفوذپذیری عروق مغزی محتوای آب مغز برای ارزیابی خیز مغزی و نمرات نورولوژیک و میزان استروژن و پروژسترون پلازما به دنبال ترومای شدید و منتشر مغزی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: محتوای آب مغزی در گروه‌های، پرواستروس، استروس نسبت به گروه‌های مت استروس، دی استروس و OVX کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$) اما در گروه‌های مت استروس و دی استروس این اختلاف معنی‌دار نبود. محتوای آبی ایوانز در گروه پرواستروس کم‌تر از گروه‌های مت استروس و مت استروس بود ($P < 0/001$). هم‌چنین در گروه دی استروس کم‌تر از OVX بود ($P < 0/01$). نمره نورولوژیک در ۴ ساعت بعد از ترومای شدید مغزی در گروه پرواستروس نسبت به گروه‌های مت استروس، دی استروس و OVX افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0/01$). در ۲۴ ساعت بعد از ترومای شدید، نمره نورولوژیک مغزی در تمام گروه‌ها بیش‌تر از گروه OVX بود ($P < 0/001$). محتوای آب مغزی، آبی ایوانز در گروه شم کم‌تر از OVX و نمره نورولوژیک در گروه شم بیش‌تر از گروه OVX بود ($P < 0/001$). نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که میزان خیز مغزی، نفوذپذیری عروق مغزی و نمرات نورولوژیک بعد از ضربه شدید مغزی بسته به فازهای مختلف سیکل استروس متفاوت می‌باشد که دلیل احتمالی این تفاوت، اختلاف در غلظت هورمون‌های جنسی استروئیدی زنانه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیکل استروس، خیز مغزی، نفوذپذیری عروق مغزی، نمرات نورولوژیک، جراحت تروماتیک مغزی، موش صحرایی.

مقدمه

جراحت تروماتیک مغزی (Traumatic brain injury, TBI) یکی از عوامل اصلی مرگ و ناتوانی در سراسر جهان می‌باشد. حداقل ۶/۲ میلیون نفر در اروپا و ۵/۳ میلیون نفر در ایالات متحده آمریکا با ناتوانی، آسیب یا معلولیت ناشی از TBI زندگی می‌کنند که مردان بالغ جوان در معرض خطر

مرگ بالایی نسبت به زنان قرار دارند [۱].

مطالعات نشان دادند که وجود هورمون‌های در حال گردش ممکن است حفاظت نورونی اولیه را در جنس ماده بعد از TBI اعمال نماید [۲]. استروژن در حفظ جریان خون مغز بعد از ترومای تجربی و کاهش خیز مغزی بعد از ترومای موثر است [۳]. شاه‌رخی و همکارانش نیز نشان داده‌اند که دوز

فارماکولوژیک استروژن و پروژسترون باعث مهار افزایش فشار داخل جمجمه‌ای (ICP) و بهبود فشار پرفیون مغزی (CCP) و شاخص‌های نورولوژیکی بعد از TBI می‌شود [۴]. احمد مولایی و همکارانش نشان داده‌اند که پروژسترون و آلوپرگنولون (متابولیت پروژسترون) هر دو موجب کاهش تشکیل خیز مغزی در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده می‌شوند [۵]. هم‌چنین استروئیدها از طریق تنظیم بیان ژن آکوپورین نمره ۴ احتمالاً در شکل‌گیری ادم بعد از تروما نقش بازی می‌کند [۶]. علاوه بر این بیان شده است که تجویز استروژن و پروژسترون در موش‌های فاقد تخمدان (OVX) جراحی ایسکمیک را کاهش می‌دهد [۷]. پروژسترون و متابولیت‌های آن، سیتوکین‌های التهابی $IL-1\beta$ و $TNF\alpha$ را در روز سوم بعد از TBI کاهش می‌دهند [۸]. گزارش شده است که تجویز پروژسترون بعد از TBI اثرات سودمندی روی نتایج عملکردی و مورفولوژیکی در موش‌های ماده فاقد تخمدان و نرها اعمال می‌کند [۹]. هم‌چنین در مطالعه دیگری سلطانی و همکارانش نشان داده‌اند که مصرف ترکیبی استروژن و پروژسترون خیز مغزی را به دنبال ضربه مغزی منتشر در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهند [۱۰]. مطالعات آزمایشگاهی چندین مکانیسم برای اثرات نوروپروتکتیو هورمون‌های جنسی مطرح کرده‌اند که شامل خواص آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها، کاهش تخریب بیش از حد ناشی از گلوتامات، افزایش بیان فاکتور آنتی‌آپوپتوتیک و فعال کردن مسیرهای MAP Kinase می‌شود [۱۱، ۱۲].

سیکل استروس در موش صحرایی شامل ۴ مرحله است. ۱- مرحله پرواستروس که در آن میزان خونی استروژن و به میزان کم‌تری پروژسترون بالا می‌باشند. ۲- مرحله استروس پروژسترون بیش‌ترین مقدار را دارد. ۳ و ۴- مراحل دی استروس و مت استروس که میزان استروژن و پروژسترون در آن‌ها کم‌ترین مقدار است [۱۳]. پیش‌آگهی از جراحی ترومای مغزی در حیوانات ماده تحت تاثیر فازهای سیکل استروس قرار می‌گیرد به طوری که در فاز پرواستروس با تخریب کم‌تر مغز بعد از جراحی ترومای مغزی در موش‌های

ماده در ارتباط است و این را به میزان بالای استروژن تولید شده در فاز پرواستروس نسبت می‌دهند. برعکس، مت استروس (کاهش میزان استروژن) با تخریب مغزی بیش‌تری همراه می‌باشد [۱۴]. موش‌های صحرایی ماده در فاز پرواستروس پاسخ بهتری در مقایسه با موش‌های ماده در مرحله استروس یا تروما بعد از هموراژی، نشان می‌دهند [۱۵]. موش‌های ماده دارای پاسخ ایمنی تشدید شده به هنگام فاز پرواستروس هستند. اعمال قلبی - عروقی و کبدی، بعد از تروما هموراژی در موش‌های صحرایی ماده پرواستروس در مقایسه با حیوانات با فازهای دیگر سیکل استروس بهتر می‌باشد [۱۶، ۱۷]، این نتایج حاکی از این است که هورمون‌های جنسی زنانه در پیامدهای ناشی از صدمات و ایسکمی مغزی نقش مهمی بازی می‌کنند.

با توجه به مطالب فوق، ما فرض کردیم که سیکل استروس در حیوانات یا سیکل قاعدگی در زنان یک متغیر مهم، نه تنها در ارتباط با پاسخ به سکتة مغزی، هموراژی، ایمونولوژیک، قلبی - عروقی و کبدی می‌باشد، بلکه هم‌چنین روی خیز مغزی و برگشت‌پذیری عصبی (پیامدهای نورولوژیک) بعد از TBI نیز احتمالاً اثر می‌گذارد، علاوه بر این با توجه به اثرات استروژن و پروژسترون در کاهش خیز مغزی و اختلالات شناختی و تخریب بافت مغزی، ما فازهای مختلف سیکل استروس را انتخاب کردیم که در فازهای مختلف آن غلظت‌های استروژن و پروژسترون خون تفاوت‌های چشم‌گیری دارند؛ بنابراین هدف مطالعه حاضر این بود که تعیین کند که اولاً آیا تفاوت در میزان خیز مغزی و پیامدهای نورولوژیک ناشی از TBI در فازهای مختلف سیکل استروس وجود دارد و ثانیاً آیا هم‌راهی بین غلظت‌های هورمون‌های استروئیدی جنسی زنانه در این فازها و متفاوت بودن شاخص‌ها در طی فازهای مختلف سیکل استروس در موش صحرایی ماده وجود دارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مداخله‌ای تجربی از ۱۰۰ سر موش صحرایی بالغ ماده نژاد AlbinoN-MARI وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده گردید که در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و حرارت 21 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و نیز محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند. این پژوهش طی مجوز شماره ۸۸-۳۸ کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفته است.

حیوان‌ها به ۶ گروه ۱۴ تایی تقسیم شده بودند. در هر گروه دو زیر گروه وجود داشت که در یک زیر گروه محتوای آب مغز، نمرات نورولوژیک (V.C.S) و همچنین غلظت‌های ۱۷- بتا استرادیول و پروژسترون پلازما و در زیر گروه دیگر محتوی آبی ایوانز به دنبال ترومای شدید منتشر مغزی اندازه‌گیری شد.

گروه اول، گروه حیوان‌های با مرحله پرو استروس: در این گروه حیوان‌های ماده با مرحله پرواستروس تحت ضربه شدید مغزی قرار گرفتند. گروه دوم، گروه حیوان‌های با مرحله استروس: در این گروه حیوان‌های ماده با مرحله استروس تحت ضربه شدید مغزی قرار گرفتند. گروه سوم، گروه حیوان‌های با مرحله مت استروس: در این گروه حیوان‌های ماده با مرحله مت استروس تحت ضربه شدید مغزی قرار گرفتند. گروه چهارم، گروه حیوان‌های با مرحله دی استروس: در این گروه حیوانات ماده با مرحله دی استروس تحت ضربه شدید مغزی قرار گرفتند. گروه پنجم، گروه فاقد تخمدان: (OVX) که بعد از برداشتن تخمدان، تحت ضربه شدید مغزی قرار گرفتند. گروه ششم، گروه شم: (Sham) حیوان‌های ماده فاقد تخمدان که فقط بی‌هوش شده و زیر دستگاه ایجاد کننده ضربه مغزی قرار گرفتند.

در تمامی این گروه‌ها ابتدا حیوان‌ها به صورت تصادفی از قفس برداشته شده بعد از انجام آزمون پاپ اسمیر و تایید لام مربوطه توسط پاتولوژیست در یکی از گروه‌های فوق قرار می‌گرفتند.

روش اندازه‌گیری استرادیول و پروژسترون در پلازما. برای بررسی غلظت هورمون‌های ۱۷- بتا استرادیول و پروژسترون نمونه خون از حیوان گرفته شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. پلازما از قسمت بالایی آن جمع‌آوری شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت ۱۷- بتا استرادیول و پروژسترون سرم با استفاده از روش (ELISA کیت BMS، آمریکا) در همه گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد و نتایج بر اساس pg/ml برای ۱۷- بتا استرادیول و ng/ml برای پروژسترون گزارش شد [۱۰].

روش رنگ‌آمیزی پاپ اسمیر. طول دوره سیکل استروس در موش صحرایی ماده ۵-۴ روز می‌باشد. این سیکل دارای ۴ مرحله می‌باشد. ۱- مرحله پرواستروس ۱۲ ساعت، ۲- مرحله استروس ۱۲ ساعت، ۳ و ۴- مراحل دی استروس و مت استروس که جمعاً حدود ۳ روز طول می‌کشد. مراحل سیکل استروس به وسیله اسمیر واژینال تعیین شد. برای اطمینان از این که موش‌های صحرایی دارای سیکل باشند، اسمیر واژینال در اول صبح تهیه می‌شد. در این روش ابتدا با استفاده از سرم فیزیولوژی به میزان ۵۰ میکرولیت واژن حیوان را لایواژ داده و سپس نمونه را بر روی لام گذاشته و با الکل ۹۶ درصد به مدت ۲۰ دقیقه فیکس می‌شد. سپس آن را از الکل بیرون آورده تا خشک شود و در نهایت با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و OG6 و EA50 آن را رنگ‌آمیزی می‌گردید. نمونه‌ها بعد از رنگ‌آمیزی با میکروسکوپ نوری مشاهده شده و مراحل مختلف سیکل استروس بر اساس ویژگی‌های سلولی کلاسیک، در نمونه‌ها مشخص شدند به طوری که مرحله پرواستروس سلول‌های اپیتلیال با هسته‌های بزرگ و مرحله استروس سلول‌های سطحی بدون هسته و مرحله مت استروس با مخلوطی از سلول‌های اپیتلیال هسته دار، سلول‌های سطحی بدون هسته و لوکوسیت‌ها و مرحله دی استروس فقط با لوکوسیت‌ها مشخص شدند [۱۸] (شکل ۱).

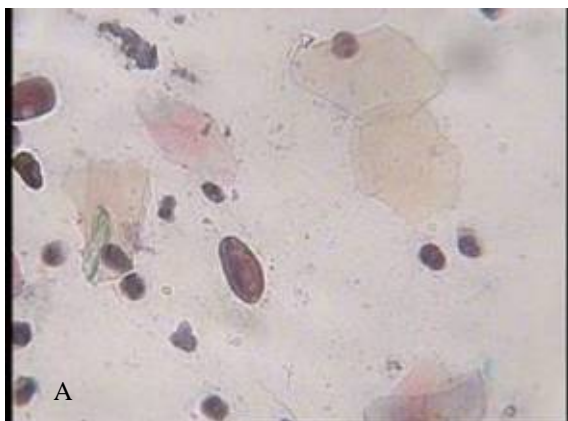
در اول صبح جراحی، حیوان‌ها بر اساس نمونه‌ها در گروه‌های با فازهای مختلف سیکل استروس قرار گرفتند. روش برداشتن تخمدان (Ovariectomy). جهت ایجاد بی‌هوشی 60 mg/kg تیوپنتال به روش داخل صفاقی به حیوان تزریق می‌شد. موهای قسمت تحتانی شکم تراشیده شده و برش افقی به طول 4-3 سانتی‌متر ایجاد می‌شد. سپس پوست، فاشیا و عضلات شکم باز شده و چربی‌ها و روده کنار زده می‌شد تا رحم و لوله‌های آن دیده شوند. لوله رحم و پایه عروقی تخمدان با نخ کاتکوت 4 در ناحیه پروگزیمال مسدود شده و از ناحیه دیستال قطع می‌شد و همین عمل در مورد تخمدان دیگر تکرار می‌شد. در انتها 2-1 ml محلول سرم فیزیولوژی داخل شکم ریخته و عضلات و پوست به روش پیوسته بخیه می‌گردید. محل زخم با محلول بتادین ضد عفونی می‌شد. حیوانات تا دو ساعت تحت مراقبت ویژه قرار می‌گرفتند. به منظور جلوگیری از تداخل هورمونی حیوان‌ها دو هفته بعد از برداشتن تخمدان‌ها مورد آزمایش آسیب مغزی قرار می‌گرفتند [10].

مغزی صفحه استیل از سر حیوان جدا شده و سریعاً به پمپ تنفسی (TSE Animal respirator compact, آلمان) وصل شده و پس از برقراری تنفس خودبه‌خودی از دستگاه تهویه مصنوعی جدا و به قفس بازگردانیده شد [10]. روش اندازه‌گیری محتوای آب مغز. برای اندازه‌گیری محتوای آب مغز بعد از خارج کردن بافت مغز در پایان 24 ساعت پس از اعمال ضربه به سر ابتدا وزن مرطوب مغز اندازه‌گیری و سپس به مدت 48 ساعت در درجه حرارت 100 درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه (Memmert, آلمان) گذاشته شد تا بافت خشک به دست آید و سپس توزین گردید و در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان آب بافت مغز به عنوان شاخص ادم مغزی به صورت درصد محاسبه شد [21-19].

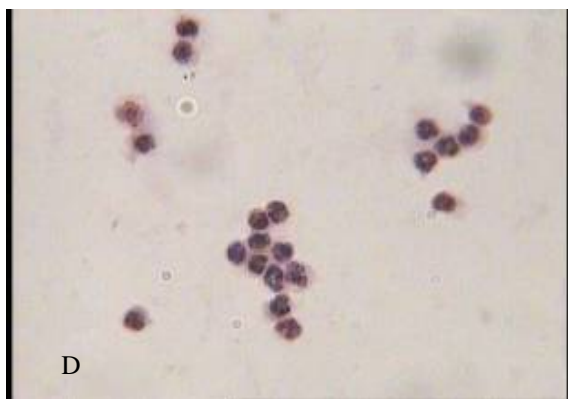
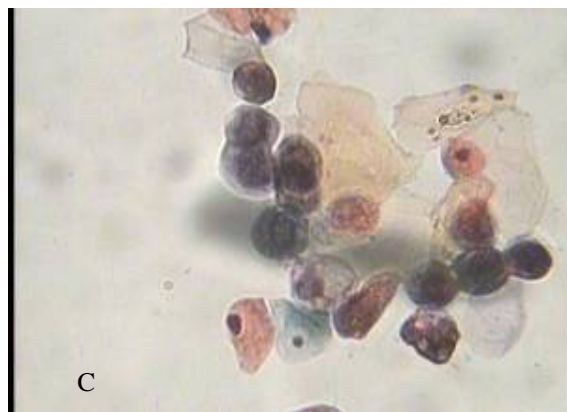
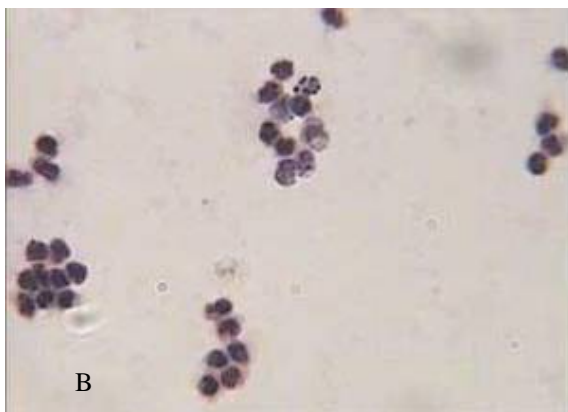
$$\text{وزن بافت خشک} - \text{وزن بافت مرطوب} \times 100 = \frac{\text{درصد محتوی آب مغز}}{\text{وزن بافت مرطوب}}$$

روش اندازه‌گیری محتوای آبی ایوانز. برای ارزیابی سلامت سد خونی - مغزی یا ارزیابی میزان نفوذپذیری عروق مغزی (BBB)، محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B Content) خارج عروقی اندازه‌گیری شد؛ میزان نفوذپذیری عروق مغزی 5 ساعت پس از القای ضربه‌ی مغزی با استفاده از رنگ آبی ایوانز خارج عروقی اندازه‌گیری شد (رنگ آبی ایوانز به پروتئین‌های سرم مانند آلبومین متصل و در شرایط تخریب سد خونی - مغزی در خارج از عروق مشاهده می‌شود). در ساعت چهارم بعد از القای ضربه‌ی مغزی، حیوان با اتر بی‌هوش و رنگ به میزان 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از طریق ورید فمورال راست تزریق شد. یک ساعت پس از تزریق، مغز حیوان با محلول سرم فیزیولوژی ایزوتونیک شستشو داده شد. در مرحله‌ی بعد، مغز با سرعت خارج و در 20 میلی‌لیتر محلول شامل استون و سولفات سدیم ریخته شد و برای مدت 24 ساعت در دستگاه تکان‌دهنده گذاشته شد، سپس محلول بالایی برداشته و با 1 میلی‌لیتر محلول تری

روش القاء ضربه مغزی. قبل از انجام عمل، کانول‌گذاری نای با افزودن 1 تا 2 درصد هالوتان به هوای تنفسی حیوان شروع می‌شد. نای حیوان جهت کنترل تنفس و جلوگیری از هیپوکسی به پمپ تنفسی (دستگاه تهویه مصنوعی) وصل می‌شد. درجه حرارت بدن از طریق یک صفحه فلزی که سیستم گرمایی در زیر آن تعبیه شده در 37 درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد. بعد از انجام برش در پوست سر و مشاهده استخوان جمجمه یک صفحه فلزی از جنس استیل به طور مرکزی در طول کرونال بین برگما و لامبدا به وسیله چسب پلی‌اکریل امید به استخوان چسبانده می‌شد تا ضربه به صورت یک‌نواخت به جمجمه وارد شود. ضربه به سر حیوان مورد نظر به روش مارمارو (Marmarou) از نوع شدید (severe) و منتشر (diffuse) توسط دستگاه القاء ضربه مغزی (ساخت گروه فیزیولوژی کرمان) وارد شد که در این روش یک وزنه 450 گرمی از داخل ستون شیشه‌ای به ارتفاع 2 متر بر روی سر حیوان بی‌هوش فرود می‌آمد. بلافاصله پس از القاء ضربه



کلرواستیک اسید مخلوط شد. میزان جذب محلول آبی ایوانز در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biotech Pharmacia، آلمان) اندازه‌گیری و سپس میزان رنگ آبی ایوانز برحسب میکروگرم در گرم بافت گزارش شد [۲۲].



شکل ۱. نمونه‌های اسمیر واژینال از ترشحات واژن موش صحرایی در مراحل مختلف سیکل استروس. A: طرح سلولی مت استروس: مخلوطی از سلول‌های اپیتلیال هسته‌دار، سلول‌های سطحی بدون هسته، لوکوسیت‌ها. B: طرح سلولی دی استروس: غالباً حاوی لوکوسیت C: طرح سلولی پرواستروس سلول‌های اپیتلیال با هسته‌های بزرگ. D: طرح سلولی استروس، سلول‌های سطحی بدون هسته. E: طرح سلولی موش‌های OVX: که فقط حاوی لوکوسیت می‌باشد.

نمره پایین‌تر باشد پیامد نورولوژی وخیم‌تر است. در این مطالعه پیامد نورولوژیکی بلافاصله بعد از ضربه (زمان صفر)، ۱، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی اندازه‌گیری شد [۴، ۱۰]. آنالیز آماری داده‌ها. از داده‌های کمی به دست آمده در گروه‌های مختلف ابتدا میزان نرمالیت (Normality plot with test) آن‌ها مورد آزمون قرار گرفته و در صورت توزیع نرمال داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه

ارزیابی پیامدهای نورولوژیک یا نمرات نورولوژیک [V.C.S (verterinary coma scale)]. پیامد نورولوژیک بر اساس جدول ۱، توسط پژوهشگری که Blind بود، به صورت نمره (۳-۱۵) در همه گروه‌ها ارزیابی شد که از مجموع سه نمره اعمال حرکتی (۱-۸)، اعمال چشمی (۱-۴) و اعمال تنفسی (۱-۳) بر اساس معیار V.C.S به دست می‌آمد و هر چه این نمره بالاتر باشد پیامد نورولوژی بهتر و هر چه این

($P < 0.001$). غلظت ۱۷- بتا استرادیول در گروه sham $8/15 \pm 0/33$ است که با OVX اختلاف معنی‌دار ندارد. غلظت پروژسترون در حیوان‌های OVX، $6/93 \pm 0/24$ ng/ml می‌باشد که این میزان به طور معنی‌دار کم‌تر از حیوان‌های با مراحل پرواستروس، استروس، مت‌استروس یا دی‌استروس است ($P < 0.001$). غلظت پروژسترون در گروه sham $5/7 \pm 0/97$ Pg/ml است که دارای اختلاف معنی‌دار با OVX نمی‌باشد، علاوه بر این میزان ۱۷- بتا استرادیول و پروژسترون در گروه‌های پرواستروس و استروس به طور معنی‌دار بیش‌تر از گروه‌های مت‌استروس و دی‌استروس است ($P < 0.001$). هم‌چنین غلظت‌های ۱۷- بتا استرادیول و پروژسترون در پرواستروس بیش‌تر از استروس است ($P < 0.01$).

جدول ۲. غلظت هورمون‌های ۱۷- بتا استرادیول و پروژسترون در مراحل مختلف سیکل استروس و در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان (OVX) و شم. داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند.

گروه	هورمون	۱۷- بتا استرادیول (Pg/ml)	پروژسترون (ng/ml)
مت استروس	*	$12/11 \pm 0/29$	$15/36 \pm 0/38$ †
دی استروس	*	$15/47 \pm 0/29$	$13/67 \pm 0/33$ †
پرو استروس	***	$60/86 \pm 1/79$	$45/34 \pm 0/41$ †††
استروس	***	$40/20 \pm 0/85$	$40/62 \pm 0/37$ †††
OVX		$7/13 \pm 0/54$	$6/93 \pm 0/24$
Sham+OVX		$8/15 \pm 0/33$	$5/7 \pm 0/97$

*: اختلاف معنی‌دار مت‌استروس با دی‌استروس با OVX ($P < 0.001$). **: اختلاف معنی‌دار پرو استروس با استروس با همه گروه‌ها ($P < 0.001$): †††: اختلاف معنی‌دار پرو استروس با دی استروس با همه گروه‌ها ($P < 0.001$): †: اختلاف معنی‌دار مت استروس یا دی استروس با OVX ($P < 0.001$).

ب- محتوای آب مغزی در مراحل مختلف سیکل استروس. محتوای آب مغزی در مراحل مختلف سیکل استروس و هم‌چنین در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان در

و تحلیل و در صورت معنی‌دار بودن آزمون اولیه، برای پی بردن اختلاف بین گروه‌ها از آزمون Tukey استفاده شد. همه داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین (Mean±SEM) بیان شد و شد سطح معنی‌دار ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از SPSS 14 انجام شد.

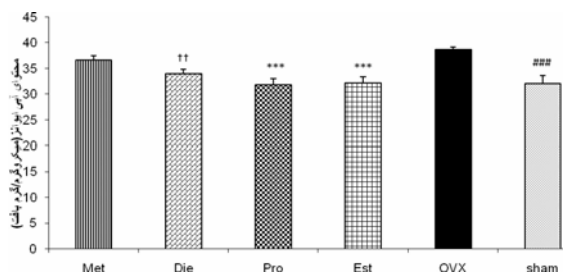
جدول ۱. معیار نمره ی نورولوژی (V.C.S)

نمره	متغیر	معیار
۸	طبیعی	۱
۷	خواب آلودگی با حرکات خودبخودی و هدفدار	
۶	خواب آلودگی، قادر نبودن به ایستادن اما حفظ خمیدگی سخت	
۶	خواب آلودگی، عقب کشیدن در برابر نیشگون گرفتن	
۵	بلند کردن سر نسبت به محرک‌های بینایی بدون خمیدگی سخت	
۴	عقب کشیدن یا پا زدن در برابر نیشگون گرفتن	
۳	پازدن خودبخودی	
۲	وضعیت اکستانسیون (خودبخودی یا در برابر محرکها)	
۱	پاسخ ندادن به تحریک	
۴	باز	
۳	باز شدن در برابر تحریک	
۲	طبیعی بودن رفلکس پلک	
۱	پاسخ ندادن پلک به تحریک	۳
۳	طبیعی	
۲	آتاکسی	
۱	آپنه	
۱۵ نمره		جمع

نتایج

الف- غلظت هورمون‌های استروئیدی جنسی. در جدول ۲ غلظت هورمون‌های ۱۷- بتا استرادیول و پروژسترون در مراحل مختلف سیکل استروس و در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان (OVX) نشان داده شده است. همان طوری که در این جدول مشاهده می‌شود، غلظت ۱۷- بتا استرادیول در حیوان‌های OVX، $7/13 \pm 0/54$ Pg/ml می‌باشد که این میزان به طور معنی‌داری کم‌تر از حیوان‌های با مراحل مت استروس، دی استروس پرواستروس یا استروس می‌باشد

گروه دی استروس کم تر از گروه های متاستروس و OVX ($P < 0.001$) است و همچنین متاستروس کم تر از OVX است ($P < 0.01$). محتوای آبی ایوانز در گروه Sham، $32/05 \pm 1/50$ میکروگرم در گرم بافت است که کم تر از گروه OVX است ($P < 0.001$).

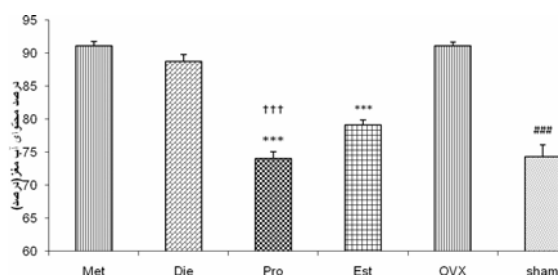


شکل ۲. اثر ترومای شدید مغزی بر محتوای رنگ آبی ایوانز در مراحل مختلف سیکل استروس و در موش های صحرایی فاقد تخمدان (OVX). داده ها به صورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است. ***: اختلاف معنی دار با همه گروه ها به غیر از استروس ($p < 0.001$). **: اختلاف معنی دار استروس با مت استروس یا OVX ($p < 0.01$). ####: اختلاف معنی دار گروه Sham با OVX ($p < 0.001$). ††: اختلاف معنی دار دی استروس با OVX ($p < 0.01$).

د- نمرات نورولوژیک (V.C.S) در مراحل مختلف سیکل

استروس. اثرات ترومای شدید مغزی بر نمرات نورولوژیک (V.C.S) در مراحل مختلف سیکل استروس و موش های صحرایی ماده فاقد تخمدان در زمان های مختلف بعد از ترومای مغزی در شکل ۳ نشان داده شده است. نمره نورولوژیک (v.c.s) در زمان صفر (فوراً بعد از ضربه مغزی) بین گروه های مختلف حدود ۳ بود که اختلاف معنی دار برای آن وجود ندارد. در ۱ ساعت بعد از ضربه مغزی (تروما) نمره نورولوژیک در گروه پرواستروس $4/5 \pm 0/54$ بود که این نمره بیش تر از نمرات گروه های متاستروس، دی استروس و OVX بود ($P < 0.01$). اختلاف معنی دار بین گروه های پرواستروس و استروس در این ساعت وجود نداشت همچنین اختلاف معنی دار بین متاستروس با دی استروس یا OVX در یک ساعت بعد از ضربه مغزی وجود نداشت. نمره نورولوژیک در ۴ ساعت بعد از ضربه مغزی در گروه پرواستروس $8/16 \pm$ بود که این نمره بیش تر از گروه های

شکل ۱ نشان داده شده است محتوای آب مغزی در گروه پرواستروس $73/97 \pm 1/12\%$ است که این میزان به طور معنی داری کم تر از محتوای آب مغزی در بقیه گروه ها می باشد ($P < 0.001$). محتوای آب مغزی در گروه استروس، $79/09 \pm 0/77$ می باشد که کم تر از گروه های متاستروس، دی استروس و OVX می باشد ($P < 0.001$). اختلاف معنی دار بین گروه های متاستروس یا دی استروس با OVX وجود ندارد. محتوای آب مغزی در گروه sham $74/27 \pm 1/85\%$ است که به طور معنی داری کم تر از OVX است ($P < 0.001$), اما اختلاف معنی دار بین گروه پرواستروس و Sham وجود ندارد.



شکل ۱. اثر ترومای شدید مغزی بر محتوای آب مغزی در مراحل مختلف سیکل استروس و در موش های صحرایی فاقد تخمدان (OVX). داده ها به صورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است. ***: اختلاف معنی دار بین پرواستروس یا استروس با گروه های مت استروس یا دی استروس یا OVX ($P < 0.001$). †††: اختلاف معنی دار پرو استروس با استروس ($P < 0.001$). ####: اختلاف معنی دار گروه Sham با OVX ($P < 0.001$).

ج- محتوای آبی ایوانز در مراحل مختلف سیکل استروس.

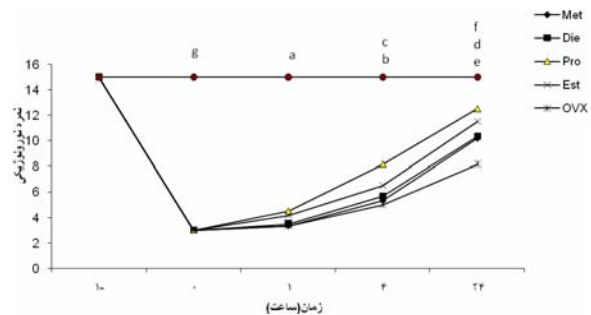
در شکل ۲ محتوای رنگ آبی ایوانز در مراحل مختلف سیکل استروس و موش های صحرایی فاقد تخمدان نشان داده شده است. محتوای آبی ایوانز در گروه پرواستروس $32 \pm 1/17$ میکروگرم در گرم بافت است که کم تر از گروه های متاستروس ($P < 0.001$) یا دی استروس ($P < 0.01$) یا OVX ($P < 0.001$) است. اختلاف معنی دار بین گروه های پرواستروس و استروس ($31/5 \pm 1/28$) وجود ندارد. محتوای آبی ایوانز در گروه استروس کم تر از گروه های متاستروس ($P < 0.001$), یا دی استروس ($P < 0.01$) یا OVX ($P < 0.001$) است. علاوه بر این محتوای آبی ایوانز در

مختلف سیکل استروس وجود دارد، روی خیز مغزی و عمل‌کرد رفتاری بعد از TBI اثر می‌گذارند.

نتایج مطالعه حاضر معرف این هستند که حفاظت نورونی بعد از جراحی تروماتیک مغزی برای حیوان‌های ماده سالم در مقایسه با حیوان‌های ماده فاقد تخمدان وجود داشت؛ علاوه بر این مراحل سیکل استروس و غلظت هورمون‌ها در شروع جراحی بر روی خیز مغزی و عمل‌کرد رفتاری اثر می‌گذارد، به طوری که محتوای آب مغزی یا خیز مغزی در موش‌های صحرایی ماده پرواستروس به طور معنی‌داری کم‌تر از حیوان‌های با مراحل دیگر سیکل استروس و حیوان‌های فاقد تخمدان است. در حیوان‌های با مرحله استروس نیز خیز مغزی آن‌ها کم‌تر از گروه‌های دی‌استروس و مت‌استروس و فاقد تخمدان بود. اگرچه از سوی دیگر محتوای آب در گروه پرواستروس بعد از TBI به اندازه حیوان‌های فاقد تخمدان قبل از TBI است، هم‌چنین محتوای آبی ایوانز یا نفوذپذیری عروق مغزی نیز در گروه‌های پرواستروس و استروس، کم‌تر از گروه‌های دی‌استروس، مت‌استروس و فاقد تخمدان بود. محتوای آبی ایوانز در حیوان‌های با مرحله دی‌استروس کم‌تر از حیوان‌های فاقد تخمدان بود و اختلاف معنی‌دار بین گروه شم و فاقد تخمدان وجود داشت.

در بخش دیگر مطالعه، داده‌ها نشان دادند که در یک ساعت بعد از TBI، نمرات نورولوژیک حیوان‌های پرواستروس و استروس با یک‌دیگر مساوی بود، اما این نمره بیش‌تر از حیوان‌های با مراحل مت‌استروس و دی‌استروس و فاقد تخمدان است، اگرچه نمرات نورولوژیک در طول زمان در همه گروه‌ها بهبود می‌یافت، اما این نمرات در ساعات ۴ و ۲۴ بعد از TBI در گروه پرواستروس بیش‌تر از گروه‌های استروس، دی‌استروس، مت‌استروس و فاقد تخمدان بود؛ علاوه بر این در این ساعات نمرات نورولوژیک گروه استروس بیش‌تر از بقیه گروه‌ها به جزء گروه پرواستروس است. در ساعت ۲۴، بین دی‌استروس و فاقد تخمدان اختلاف معنی‌دار وجود دارد، اگرچه نمره نورولوژیک در ۲۴ ساعت بعد از

استروس، مت‌استروس، دی‌استروس و OVX بود ($P < 0.001$). هم‌چنین نمره در گروه استروس $6/5 \pm 0/83$ بود که بیش‌تر از مت‌استروس ($P < 0/05$) و OVX بود ($P < 0/001$). اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مت‌استروس، دی‌استروس و OVX در این ساعت وجود نداشت. نمره‌ی نورولوژیک در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی در گروه پرواستروس $12/5 \pm 0/54$ بود که این نمره بیش‌تر از استروس ($P < 0/01$)، مت‌استروس، دی‌استروس و OVX بود ($P < 0/001$). نمره‌ی نورولوژیک در ساعت ۲۴ بعد از تروما در گروه استروس $11/5 \pm 0/54$ بود که این نمره بیش‌تر از نمرات مت‌استروس، دی‌استروس و OVX بود ($P < 0/01$). نمره نورولوژیک در گروه دی‌استروس $10/33 \pm 0/5$ بود که این نمره بیش‌تر از گروه OVX ($8/16 \pm 0/75$) بود ($P < 0/001$).



شکل ۳: اثر ترومای شدید مغزی بر نمرات نورولوژیک (V.C.S) در مراحل مختلف سیکل استروس و در موش‌های صحرایی ماده فاقد تخمدان (OVX) در زمان‌های مختلف بعد از تروما. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده‌اند. a: اختلاف معنی‌دار گروه پرواستروس با گروه‌های مت‌استروس، دی‌استروس و OVX ($P < 0/01$). b: اختلاف معنی‌دار گروه پرواستروس با گروه‌های مت‌استروس، دی‌استروس و OVX ($P < 0/001$). c: اختلاف معنی‌دار گروه استروس با گروه‌های مت‌استروس و یا OVX ($P < 0/001$). d: اختلاف معنی‌دار گروه پرواستروس با گروه‌های استروس یا مت‌استروس، دی‌استروس و OVX ($P < 0/001$). e: اختلاف معنی‌دار گروه استروس با گروه‌های مت‌استروس، دی‌استروس و OVX ($P < 0/01$). f: اختلاف معنی‌دار گروه دی‌استروس با گروه‌های استروس یا OVX ($P < 0/001$). g: اختلاف معنی‌دار گروه Sham با OVX ($P < 0/001$).

بحث و نتیجه‌گیری

هدف مطالعه حاضر این است که تعیین کنیم که آیا غلظت‌های متفاوت هورمونی قبل از جراحی که در مراحل

مراحل مختلف سیکل استروس، به علت تغییرات در میزان بیان این گیرنده‌ها باشد. زیرا گزارش شده است که در مرحله دی‌استروس گیرنده آلفای استروژن (ER α) در بعضی از هسته‌های مغزی موش صحرایی کم‌تر در مقایسه با مرحله پرواستروس هستند [۳۱]. در هسته‌های قوسی هیپوتالاموسی کم‌ترین میزان ER α ، به هنگام استروس و بالاترین میزان به هنگام پرواستروس وجود دارد [۳۲]. افزایش گیرنده‌های ER α و ER β در یاخته‌های عقده‌ای ریشه پشتی نخاع موش صحرایی در پرواستروس در مقایسه با متاستروس وجود دارد [۳۳]. این احتمال وجود دارد که شاید تغییرات در خیز مغزی که در مراحل مختلف سیکل استروس رخ می‌دهد از این طریق گیرنده غشایی به نام GPR30 اعمال شده باشد [۳۴]. شاید کاهش در تولید آنزیم‌های التهابی مغزی یعنی iNOS و COX-2 که در فاز پرواستروس به علت بیش‌تر بودن میزان استروژن رخ می‌دهد [۳۵]، علت تفاوت در خیز مغزی مشاهده شده در مطالعه حاضر باشد.

طرح تغییرات هورمونی که در مراحل مختلف سیکل استروس در مطالعه حاضر مشاهده شد، توسط مطالعات دیگران نیز تایید شده است [۳۶، ۱۵، ۱۳]. اگر چه گزارش‌های مخالف با مطالعه حاضر نیز وجود دارد به عنوان مثال، برای میزان استروژن در مراحل غیر استروس و پرواستروس اختلاف وجود ندارد و این‌که پروژسترون در فاز استروس بیش‌ترین مقدار است [۳۷].

تغییرات اثر حفاظت نورونی ناشی از هورمون‌های جنسی زنانه در طول مراحل مختلف سیکل استروس توسط مطالعات دیگران نیز گزارش شده است، از جمله کوفتگی مغزی ناشی از TBI در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان بیش‌تر از حیوانات ماده جراحی دیده با مراحل پرواستروس یا غیر پرواستروس است [۲۳]. در مرحله پرواستروس تخریب کم‌تر مغز بعد از ایسکمی مغزی در مقایسه با فاز متاستروس وجود دارد [۱۴]. در هنگام پرواستروس پاسخ التهابی در عروق مغزی کم‌ترین مقدار است [۳۵]. بعد از همورژی، پاسخ در فاز پرواستروس بهتر از پاسخ در فازهای دیگر است [۳۸، ۳۹].

TBI در گروه پرواستروس بیش‌ترین مقدار است، اما کم‌تر از شم است.

مکانیسم دقیق این که چرا خیز مغزی، نفوذپذیری عروق مغزی و برگشت‌پذیری عصبی (نمرات نورولوژیک) در مراحل مختلف سیکل استروس متفاوت است، مشخص نمی‌باشد، اما به نظر می‌رسد که تفاوت در غلظت پلاسمایی هورمون‌های جنسی زنانه اندوژن قبل از جراحی، منشاء این اختلاف باشد، زیرا از یک سوی در این مطالعه نشان داده شد که میزان پلاسمایی ۱۷- بتا استرادیول و هم‌چنین پروژسترون در حیوان‌های پرواستروس بیش‌ترین مقدار در مقایسه با بقیه گروه‌ها است، علاوه بر این در استروس، غلظت این هورمون‌ها بیش‌تر از گروه‌های متاستروس، دی‌استروس و فاقد تخمدان و در متاستروس یا دی‌استروس بیش‌تر از حیوان‌های فاقد تخمدان است و از سوی دیگر مطالعات قبلی اثرات محافظت نورونی مشاهده شده در این مطالعه را به هورمون‌های استروژن و پروژسترون نسبت داده‌اند: کاهش خیز مغزی و محتوای رنگ آبی ایوانز و افزایش نمرات نورولوژیک توسط مصرف تنهای استروژن یا پروژسترون [۵] یا با مصرف توأم استروژن و پروژسترون [۱۰] کاهش ICP و افزایش CPP توسط هورمون‌های جنسی زنانه [۴]. حفظ جریان خون مغزی و کاهش خیز مغزی بعد از TBI [۳]، کاهش حجم کوفتگی مغزی توسط هورمون‌های جنسی زنانه [۲۳]. عمل ضد اکسیدانی استروژن، افزایش بیان فاکتور آنتی‌آپوپتیک، فعال شدن مسیرهای پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن (MAPK) [۲۴، ۲۵]، کاهش اینترلوکین-۱، اینترلوکین-۶ و TNF- α [۲۶]. احتمالاً پروژسترون نیز از طریق عمل بر روی نفوذپذیری عروق، عمل آنتی‌اکسیدانی، کاهش ماتریکس متالو پروتیناز، تغییرات در گیرنده گابا و یا کاهش NO و PGE2 اثرات ضد خیزی خود را اعمال کرده است [۲۱-۳۰].

از آن جایی که گزارش شده است که میزان بیان گیرنده‌های استروژن در CNS در پاسخ به تغییرات غلظت پلاسمایی استروژن تغییر می‌کند، این احتمال نیز وجود دارد که شاید تغییرات مشاهده شده در پاسخ‌های ناشی از TBI در طی

اثر ناشی از استروژن یا پروژسترون را مشخص کند و ثانیاً با توجه به این‌که اعلام شده است که مکانیسم‌های غیر ژنومیک و ژنومیک در حفاظت نورونی ناشی از هورمون‌های استروئیدی جنسی موثر هستند [۴۴]، در مطالعات آینده تعیین مکانیسم دقیق اثرات این هورمون‌ها در مراحل مختلف سیکل استروس مشخص شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان می باشد، بدین وسیله از زحمات مسیولین مرکز فوق تشکر می شود.

منابع

- [1] Ottochian M, Salim A, Berry C, Chan LS, Wilson MT, Margulies DR. Severe traumatic brain injury: is there a gender difference in mortality? *Am J Surg* 2009; 197: 155-158.
- [2] Alkayed NJ, Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD, Miller VM. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats editorial comment. *Stroke* 2000; 31: 161-168.
- [3] Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma* 2000; 17: 367-388.
- [4] Shahrokhi N, Khaksari Mohammad SZ, Nakhaei N, Mahmoudi M, Nemati Ali. The effect of sex steroid hormones on brain edema and intracranial pressure after experimental traumatic brain injury in rats. *Koomesh* 2008; 11: 263-272. (Persian).
- [5] Ahmad molaei L, Khaksari M, Sepehri Gh, Dabiri Sh, Asadikaram Gh, Mahmoudi M, et al. Comparison of the effects of progesterone, allopregnanolone and genderon suppressing edema formation after traumatic brain injury in rats. *J Kerman Uni Med Sci* 2008; 15: 47-59. (Persian).
- [6] Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 778-784.
- [7] Toung TJ, Chen TY, Littleton-Kearney MT, Hurn PD, Murphy SJ. Effects of combined estrogen and progesterone on brain infarction in reproductively senescent female rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 1160-1166.
- [8] He J, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2004; 189: 404-412.
- [9] O'Connor CA, Cernak I, Johnson F, Vink R. Effects of progesterone on neurologic and morphologic outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* 2007; 205: 145-153.
- [10] Soltani Z, khaksari mohammad SN, nakhaei N, sheybani V. Effect of combined administration of estrogen and progesterone on brain edema and neurological outcome after traumatic brain injury in female rats. *Iranian j endocrin metabolism* 2009; 10: 629-638. (Persian).
- [11] Cyr M, Ghribi O, Thibault C, Morissette M, Landry M, Di Paolo T. Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors. *Brain Res Rev* 2001; 37: 153-161.
- [12] Sugishita K, Li F, Su Z, Barry WH. Anti-oxidant effects of estrogen reduce $[Ca^{2+}]_i$ during metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 331-336.
- [13] Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in

موش‌های صحرایی ماده در فاز پرواستروس پاسخ قلبی و کبدی بهتری به تروما - هموراژی در مقایسه با فازهای دیگر نشان می‌دهند [۱۶]. موش‌های صحرایی ماده با فاز پرواستروس عمل‌کرد بهتری در ارتباط با یادگیری فضای در مقایسه با موش‌های استروس داشتند [۴۰]. میزان جراحی ناشی از TBI در مرحله پرواستروس کم‌تر از سایر مراحل است [۲۳]. در طول سیکل استروس تغییرات در پاسخ به التهاب وجود دارد که شاید این تغییرات به علت استروژن اندوژن باشد [۳۵]. از آن جایی که یافته‌های آزمایشگاهی پشتی‌بان کار آزمایشی بالینی هستند، نتایج مطالعه حاضر می‌تواند پاسخ متفاوت زنان به TBI را که در مراحل مختلف سیکل قاعدگی هستند، پیش‌بینی نماید و تغییرات در احتباس مایع در انسان به هنگام سیکل قاعدگی را تفسیر نماید.

نتایج مخالف، با نتایج مطالعه حاضر نیز گزارش شده است، از جمله، حالت هورمونی در سیکل استروس در زمان جراحی روی حجم کوفتگی مغزی اثر ندارد [۲۳]. غلظت استروژن و پروژسترون در سیکل استروس در زمان جراحی روی مهارت حرکتی و یادگیری فضایی موش‌های صحرایی بعد از TBI اثر نداشت [۴۲، ۴۱، ۱۴]. عمل‌کرد شناختی در موش‌های صحرایی ماده با مرحله پرواستروس، در مقایسه با استروس نارسا شده است [۴۰]. Hampson نیز گزارش نموده است که عمل‌کرد مهارت فضایی معین در طول سیکل قاعدگی در خانم‌های بالغ در زمانی که استروژن پائین است، بهتر است [۴۳]. دلایل احتمالی اختلاف نتایج فوق با مطالعه حاضر می‌تواند مربوط به نوع TBI، حیوان مورد آزمایش، نوع مهارت اندازه‌گیری شده و میزان هورمون استروئیدی مصرف شده باشد.

ما نتیجه گرفتیم که در طول سیکل استروس پاسخ التهاب مغزی به جراحی شدید (TBI) بستگی به این دارد که حیوان در کدام یک از مراحل سیکل استروس باشد و این‌که غلظت استروژن و پروژسترون در زمان جراحی روی میزان خیز مغزی و پیامدهای نورولوژیک بعد از TBI اثر دارد. آزمایش‌های بیش‌تری لازم است که اولاً اهمیت این احتمال

following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Exp Neurol* 2010; 226: 183-190.

[29] Maggi A, Perez J. Progesterone and estrogens in rat brain: Modulation of GABA ([gamma]-aminobutyric acid) receptor activity. *Eur J pharmacol* 1984; 103: 165-168.

[30] Smith SS, Waterhouse BD, Chapin JK, Woodward DJ. Progesterone alters GABA and glutamate responsiveness: a possible mechanism for its anxiolytic action. *Brain Res* 1987; 400: 353-359.

[31] Haywood SA, Simonian SX, van der Beek EM, Bicknell RJ, Herbison AE. Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology* 1999; 140: 3255-3263.

[32] Shughrue PJ, Bushnell CD, Dorsa DM. Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology* 1992; 131: 381-388.

[33] Taleghany N, Sarajari S, DonCarlos LL, Gollapudi L, Oblinger MM. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res* 1999; 57: 603-615.

[34] Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 477-482.

[35] Sunday L, Tran MM, Krause DN, Duckles SP. Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 291: E261-267.

[36] Milad MR, Igoe SA, Lebron-Milad K, Novales JE. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience* 2009; 164: 887-895.

[37] Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 [beta] throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1974; 94: 1704-1708.

[38] Slimmer LM, Blair ML. Female reproductive cycle influences plasma volume and protein restitution after hemorrhage in the conscious rat. *Am J Physiol* 1996; 271: R626-633.

[39] Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Enhanced immune responses in females, as opposed to decreased responses in males following haemorrhagic shock and resuscitation I. Cytokine 1996; 8: 853-863.

[40] Warren SG, Juraska JM. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosci* 1997; 111: 259-266.

[41] Frye CA. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiol Behav* 1995; 57: 5-14.

[42] Galea LA, Kavaliers M, Ossenkopp KP, Hampson E. Gonadal hormone levels and spatial learning performance in the Morris water maze in male and female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Horm Behav* 1995; 29: 106-125.

[43] Hampson E. Estrogen-related variations in human spatial and articulatory-motor skills. *Psychoneuroendocrinology* 1990; 15: 97-111.

[44] Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals* 2008; 16: 140-153.

toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; 80: 84-97.

[14] Wagner AK, Willard LA, Kline AE, Wenger MK, Bolinger BD, Ren D, et al. Evaluation of estrous cycle stage and gender on behavioral outcome after experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 2004; 998: 113-121.

[15] Jarrar D, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. The female reproductive cycle is an important variable in the response to trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart and Circ Physiol* 2000; 79: H1015-1021.

[16] Yang S, Choudhry MA, Hsieh YC, Hu S, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Estrus cycle: influence on cardiac function following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2807-2815.

[17] Yang S, Hu S, Choudhry MA, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Anti-rat soluble IL-6 receptor antibody down-regulates cardiac IL-6 and improves cardiac function following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 620-630.

[18] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62: 609-614.

[19] Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Luiten PG, Limburg M. Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review. *Stroke* 2001; 32: 2433-2438.

[20] Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma* 1988; 5: 1-15.

[21] Onal C, Unal F, Turantan MI, Uzum G, Hasanoglu A, Kaynar MY. The effect of intraventricular albumin in experimental brain oedema. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139: 661-668.

[22] Chakir M, D'orleans-Juste P, Plante GE. Neutral endopeptidase inhibition, a new approach in the exploration of diabetic vasculopathy in rats. *Eur J pharmacol* 1995; 285: 11-18.

[23] Bramlett HM, Dietrich WD. Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *J neurotrauma* 2001; 18: 891-900.

[24] Mize AL, Shapiro RA, Dorsa DM. Estrogen receptor-mediated neuroprotection from oxidative stress requires activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2003; 144: 306-312.

[25] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 92-99.

[26] Khaksari M, Soltani Z, Shahrokhi N, Moshtaghi G, Asadikaram G. The role of estrogen and progesterone, administered alone and in combination, in modulating cytokine concentration following traumatic brain injury. *Can J Physiol Pharmacol* 2011; 89: 31-40.

[27] Bedwani JR, Marley PB. Enhanced inactivation of prostaglandin E2 by the rabbit lung during pregnancy or progesterone treatment. *Br J Pharmacol* 1975; 53: 547-554.

[28] Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Hua F, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction

Effects of different phases of estrous cycle on brain edema and neurological outcomes after severe traumatic brain injury in female rats

Ali Siahposht khachaki (M.Sc)¹, Mohammad Khaksari haddad (Ph.D)^{*2} Nader Shahrokhi (Ph.D)¹
Gholamreza Sepehri(Ph.D)¹

1- Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2 - Physiology Research Center and Bam International Unit, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received: 6 Dec 2010 Accepted: 10 May 2011)

Introduction: Sex is one of the main recovery parameters after traumatic brain injury (TBI). During estrus cycle phase, plasma estrogen and progesterone levels are very different. So in this study, we have assessed different effects of these phases in brain edema and neurological outcomes.

Materials and Methods: Adult female Albino-N-MARI rats were divided into 6 groups (14 per group) including metestrus, diestrus, proestrus, estrus, ovariectomized (OVX) rats, and sham group (without TBI and ovary). In all groups, brain water content for the measurement of brain edema, Evans blue content for the measurement of brain vascular permeability, neurological scores, plasma estrogen and progesterone levels were assessed after severe TBI.

Results: Brain water content in diestrus, proestrus and estrus groups showed a significant decrease as compared with OVX group ($P < 0.001$) but it was not significant in metestrus group. Evans blue content in proestrus group was lower than estrus and OVX groups ($P < 0.001$). Also, in diestrus group it was lower than OVX group ($P < 0.01$). Neurological scores showed significant increases in proestrus group 4 hours after severe TBI as compared with metestrus, diestrus and OVX groups ($P < 0.01$). 24 hours after severe TBI, neurological scores in all groups were higher than OVX ($P < 0.001$). Brain water content and brain vascular permeability in sham group was lower than OVX, besides neurological scores in sham group were higher than OVX ($P < 0.001$).

Conclusion: This study showed that brain edema, Evans blue content and neurological scores after severe TBI are related to estrus cycle different phases. This could be related to differences in female sex hormones in different phases of estrus cycle.

Key word: Estrus cycle, TBI, Brain edema, Brain vascular Permeability, Neurological scores, Rat

* Corresponding author: Fax: +98 341 3220081 ; Tel: +98 341 3220081
khaksar38@yahoo.co.uk